

AB

## English Abstract for JP 7-504808

**CDR-grafted humanised chimeric T cell antibodies - inhibit T cell proliferation, for treating T-cell mediated diseases e.g. graft-versus-host disease, auto-immune-diseases etc.**

Patent Assignee: UNIV CAMBRIDGE TECH SERVICES LTD (UYCA-N); WALDMANN H (WALD-I); WALSH L (WALS-I); WELLCOME FOUND LTD (WELL ); CROWE J S (CROW-I); LEWIS A P (LEWI-I)

Inventor: CROWE J S; LEWIS A P; WALDMANN H; WALSH L

Number of Countries: 019 Number of Patents: 008

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9311237	A1	19930610	WO 92GB2251	A	19921204	199324 B
JP 7504808	W	19950601	WO 92GB2251	A	19921204	199530
			JP 93509972	A	19921204	
EP 667902	A1	19950823	EP 92924782	A	19921204	199538
			WO 92GB2251	A	19921204	
US 5502167	A	19960326	WO 92GB2251	A	19921204	199618
			US 94244626	A	19940715	
JP 3339637	B2	20021028	WO 92GB2251	A	19921204	200278
			JP 93509972	A	19921204	
EP 667902	B1	20030319	EP 92924782	A	19921204	200325
			WO 92GB2251	A	19921204	
DE 69232968	E	20030424	DE 632968	A	19921204	200335
			EP 92924782	A	19921204	
			WO 92GB2251	A	19921204	
ES 2194011	T3	20031116	EP 92924782	A	19921204	200381

Abstract (Basic): WO 9311237 A

A humanised antibody has an amino acid sequence of the CDRs derived from the sequence of the CDRs of a monoclonal antibody (MAb) having the specificity of binding to resting and activated T-cells, inhibiting T-cell proliferation and lysing T-cells from mice transgenic for human CD2 and in which sufficient of the amino acid sequence of each CDR has been retained to provide the same specificity for the humanised antibody.

Also claimed are a humanised antibody in which sufficient of the amino acid sequence of each CDR shown below is provided such that the antibody is capable of binding to a human T-cell antigen: light chain CDR1 (seq. ID3 and 4), CDR2 (seq. ID5 and 6), CDR3 (seq. ID7 and 8), heavy chain CDR1 (seq. ID 11 and 12), CDR2 (seq. ID 13 and 14), CDR3 (seq. ID 15 and 16), a DNA sequence encoding the light chain or the heavy chain of a humanised antibody, an expression vector which incorporates DNA sequence above; and a host transformed with the expression vector.

The humanised antibodies are prep'd. by expression of DNA encoding the heavy and light chains in a host. The CDRs are pref. derived from the rat IgG2a anti-human T-cell monoclonal antibody YTH 655(5)6.

USE - The humanised antibodies can be used for the treatment or prophylaxis of T-cell mediated diseases such as graft versus host disease, transplant rejection and autoimmune diseases such as Type I diabetes, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and myasthenia gravis. They can also be used to prepare immunotoxins. They can also be used for T-cell typing, for isolating specific YTH655 antigen bearing cells or fragments of the receptor and for vaccine prep'n

特表7-50x808

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 5 : C12N 15/13, 15/62, C12P 21/08 A61K 39/395, C12N 5/10 C07K 15/28	A1	(11) International Publication Number: WO 93/11237 (43) International Publication Date: 10 June 1993 (10.06.93)
(21) International Application Number: PCT/GB92/02251 (22) International Filing Date: 4 December 1992 (04.12.92)  (30) Priority data: 9125979.6 6 December 1991 (06.12.91) GB		(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants ( <i>for US only</i> ) : CROWE, James, Scott [GB/GB]; LEWIS, Alan, Peter [GB/GB]; Wellcome Research Laboratories, Langley Court, Beckenham, Kent BR3 3BS (GB).  (74) Agent: MARCHANT, James, Ian; Elkington and Fife, Prospect House, 8 Pembroke Road, Sevenoaks, Kent TN13 1XR (GB).
(71) Applicant ( <i>for all designated States except US</i> ): THE WELL-COME FOUNDATION LIMITED [GB/GB]; Unicorn House, 160 Euston Road, London NW1 2BP (GB).  (71)(72) Applicants and Inventors: WALDMANN, Herman [GB/GB]; WALSH, Louise [GB/GB]; Cambridge University, Department of Pathology, Immunology Division, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QP (GB).		(81) Designated States: JP, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Published <i>With international search report.</i>
(54) Title: CDR GRAFTED HUMANISED CHIMERIC T-CELL ANTIBODIES		

## (57) Abstract

A humanised antibody is provided in which the amino acid sequence of the CDRs is derived from the sequence of the CDRs of a monoclonal antibody having the specificity of binding to resting and activated T-cells, inhibiting T-cell proliferation and lysing T-cells from mice transgenic for human CD2 and in which sufficient of the amino acid sequence of each CDR has been retained to provide the same specificity for the humanised antibody.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12)公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-504808

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)6月1日

(51)Int.Cl. <sup>*</sup>	識別記号	序内整理番号	F I
C 12 P 21/08		9161-4B	
A 61 K 39/395	A B C	9284-4C	
C 07 K 16/18		8318-4H	
		9281-4B	C 12 N 15/00
		7729-4B	5/00 Z N A A
			B
			審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 16 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願平5-509972  
(86) (22)出願日 平成4年(1992)12月4日  
(85)翻訳文提出日 平成6年(1994)6月6日  
(86)国際出願番号 PCT/GB92/02251  
(87)国際公開番号 WO93/11237  
(87)国際公開日 平成5年(1993)6月10日  
(31)優先権主張番号 9125979.6  
(32)優先日 1991年12月6日  
(33)優先権主張国 イギリス(GB)  
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M  
C, NL, PT, SE), JP, US

(71)出願人 ザ・ウエルカム・ファウンデーション・リ  
ミテッド  
イギリス国、エヌダブリュ1・2ビービ  
ー、ロンドン、ユーストン・ロード 160,  
ユニコーン・ハウス  
(71)出願人 ワルドマン、ハーマン  
イギリス国、シービー2・1キュービー、  
ケンブリッジ、テニス・コート・ロード  
(番地無し)、イムノロジー・ディビジョ  
ン、デパートメント・オブ・パソロジー、  
ケンブリッジ・ユニバーシティ  
(74)代理人 弁理士 鈴江 武彦 (外3名)

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 CDRをグラフトしたヒト化キメラT細胞抗体

(57)【要約】

ヒト化抗体が開示される。このヒト化抗体は、ヒトCD2を導入されたトランシスジェニックマウス由来の休止T細胞および活性化T細胞に結合し、該T細胞の増殖を阻害し、且つ該細胞を溶解するような特異性を有するモノクローナル抗体のCDR配列に由来したCDRアミノ酸配列を有し、また夫々のCDRのアミノ酸配列が充分に保存されていて、上記と同じ特異性が与えられている。更に、上記ヒト化抗体の製造方法、該方法に用いられる発現ベクター、並びに上記ヒト化抗体を含有する薬剤組成物が開示される。

特表平7-504808 (2)

請求の範囲

1. ヒト化抗体であって、その CDR のアミノ酸配列が、ヒト CD 2 を導入されたトランスジェニックマウス由来の休止 T 細胞および活性化 T 細胞に結合し、該 T 細胞の増殖を阻害し、且つ該細胞を溶解するような特異性を有するモノクローナル抗体の CDR 配列に由来し、また夫々の CDR のアミノ酸配列が充分に保存されていて、上記と同じ特異性が与えられているヒト化抗体。

2. 請求項 1 に記載のヒト化抗体であって、前記モノクローナル抗体がマウスモノクローナル抗体またはラットモノクローナル抗体であるヒト化抗体。

3. ヒト化抗体であって、該抗体がヒト T 細胞抗原に結合できるように、夫々の CDR の下記アミノ酸配列が充分に与えられているヒト化抗体が提供される。

軽鎖 : CDR 1 (配列 ID番号 3 および 4)

CDR 2 (配列 ID番号 5 および 6)

CDR 3 (配列 ID番号 7 および 8)

重鎖 : CDR 1 (配列 ID番号 11 および 12)

CDR 2 (配列 ID番号 13 および 14)

CDR 3 (配列 ID番号 15 および 16)

4. 請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載の抗体であって、軽鎖可変ドメインのフレームワーク領域が、タンパク [SIGKV] における可変ドメインのフレームワーク領域に対する実質的相間性を有する抗体。

5. 請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載の抗体であって、重

鎖可変ドメインのフレームワーク領域が、タンパク KOL における可変ドメインのフレームワーク領域に対する実質的相間性を有する抗体。

6. 請求項 1 ~ 5 の何れか 1 項に記載の抗体であって、前記 CDR が、請求項 3 で特定した軽鎖の CDR 1 ~ 3 および重鎖の CDR 1 ~ 3 である抗体。

7. 請求項 1 ~ 6 の何れか 1 項に定義したヒト化抗体を製造する方法であって、前記ヒト化抗体の軽鎖をコードする第一の発現ベクターおよび前記ヒト化抗体の重鎖をコードする第二の発現ベクターで形質転換された宿主を、夫々の鎖が発現される条件下で確約することと、こうして発現された鎖の組み立てにより形成された前記ヒト化抗体を単離することとを具備した方法。

8. 請求項 7 に記載の方法であって、前記第一の発現ベクターおよび前記第二の発現ベクターが同じベクターである方法。

9. 請求項 1 ~ 6 の何れか 1 項に定義したヒト化抗体の軽鎖または重鎖をコードする DNA 配列。

10. 請求項 9 に記載の DNA 配列を組み込んだ発現ベクター。

11. 請求項 10 に記載の発現ベクターで形質転換された宿主。

12. 細胞毒剤に結合された請求項 1 ~ 6 の何れか 1 項に記載のヒト化抗体を具備する免疫毒素。

13. 薬理的に許容され得るキャリアまたは精制剂と、請

求項 1 ~ 6 の何れか 1 項に記載のヒト化抗体とを含有する薬剤組成物。

14. 請求項 13 に記載の組成物であって、前記ヒト化抗体が細胞毒剤に結合された免疫毒素を含有する組成物。

明細書

CDR をグラフトしたヒト化キメラ T 細胞抗体

本発明は、ヒト CD 2 を導入されたトランスジェニックマウス [anti transport for IgG2 (IgG2)] 由来の休止 T 細胞および活性化 T 細胞に結合し、該 T 細胞の増殖を阻害し、また該 T 細胞を溶解するヒト化抗体に関する。また、このような抗体の製造および該抗体を含有する薬剤組成物に関する。

抗体は、典型的には、ジスルフィド結合によって連結された二つの重鎖と、二つの軽鎖とを具備している。夫々の軽鎖は、ジスルフィド結合によって重鎖に結合している。夫々の重鎖の一端には、可変ドメインおよびこれに隣接する定常ドメインを有している。夫々の軽鎖は、一端に可変ドメインを有し、他端に定常ドメインを有している。この軽鎖の可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整合するよう並べられている。軽鎖の定常ドメインは、重鎖の最初の定常ドメインと整合するよう並べられている。軽鎖および重鎖の定常ドメインは、該抗体の抗原に対する結合には直接関与しない。

軽鎖および重鎖の夫々の対における可変ドメインは、抗原結合部位を形成する。軽鎖および重鎖上の該ドメインは同一の一般構造を有しており、夫々のドメインは、四つのフレームワーク領域（配列は比較的保存されている）と、これらを連結する三つの相間性決定領域（CDR）とを具備している。この四つのフレームワーク領域は大略 β シートコンホメーションをとっており、CDR は該 β シート構造を連結するル

### 特表平7-504808 (3)

ブ（場合によってはシート構造の一部も）を形成している。これらCDRは、フレームワーク領域によって他のCDRに纏めて近接した状態で保持されており、抗原結合部位の形成に寄与している。抗体のCDRおよびフレームワーク領域は、Bebel et al. (「免疫学的に興味あるプロモータの配列」: US Dept. of Health and Human Services, US Government Printing Office, 1967) によって決定され得る。

変異抗体（第抗体可変ドメインのCDRがフレームワークとは異なる程度に由来する）の型造りは、EP-A-0239400に開示されている。該CDRは、ラット・モノクローナル抗体またはマウス・モノクローナル抗体から誘導れ得る。この変異抗体における可変ドメインのフレームワーク及び定常ドメインは、ヒト抗体から誘導られ得る。このようなヒト化抗体は、ラット抗体またはマウス抗体に対してヒトが示す免疫応答に比較すると、ヒトに投与されたときに殆ど無視し得る免疫応答しか誘起しない。ヒト化CAMPATH-1抗体(Campath)はウェルカム・ファウンデーション社の商標であるが、EP-A-0328401に開示されている。

ヒトT細胞は免疫応答の調節に重要な役割を果たす。従って、抗T細胞抗体は、イン・ヒボ投与されたときに免疫抑制剤となり得る。その結果として、このような抗体は、例えば移植／宿主障害、移植拒絶反応、並びにリューマチ性関節炎の治療に有用であり得る。

抗T細胞抗体である非ヒト・モノクローナル抗体が作製されている。しかし、非ヒト・モノクローナル抗体はヒト補体

を特に良好に固定せず、ヒト患者に注射されたときに免疫原となる。WO-89/09622には、ヒト定常ドメイン及びマウス可変ドメインで構成されたキメラ抗体が提案されている。しかし、顕著な免疫原性の問題は未解決のままである。

本発明の一つの側面に従えば、ヒト化抗体であって、そのCDRのアミノ酸配列が、ヒトCD2を導入されたトランスジュニッカマウス由来の休止T細胞および活性化T細胞に結合し、該T細胞の増殖を阻害し、且つ該細胞を溶解するような特異性を有するモノクローナル抗体のCDR配列に由来し、また夫々のCDRのアミノ酸配列が充分に保存されている結果、上記と同じ特異性が与えられているヒト化抗体が提供される。

本発明の別の側面に従えば、ヒト化抗体であって、該抗体がヒトT細胞抗原に結合できるように、夫々のCDRの下記アミノ酸配列が充分に与えられるヒト化抗体が提供される。

経緯：CDR1(配列ID番号3および4)  
CDR2(配列ID番号5および6)  
CDR3(配列ID番号7および8)  
経緯：CDR1(配列ID番号11および12)  
CDR2(配列ID番号13および14)  
CDR3(配列ID番号15および16)

該抗体は、好ましくは天然抗体またはそのフラグメントの構造を有する。従って、該抗体は完全抗体、(F<sup>a</sup>b<sup>-</sup>)<sub>n</sub>、フラグメント、F<sub>a</sub>bフラグメント、軽鎖二量体または重鎖二量体であり得る。該抗体はIgG1、IgG2、IgG3

もしくはIgG4のようなIgG、またはIgM、IgA、IgEもしくはIgDであり得る。抗体重鎖の定常ドメインは選択選択される。軽鎖定常ドメインは、カッパ定常ドメイン又はラムダ定常ドメインであり得る。

該抗体は、WO-86/01533に開示されたタイプのキメラ抗体であり得る。WO-86/01533に従うキメラ抗体は、抗原結合領域および非免疫グロブリン領域を具備している。この抗原結合領域は、抗体の軽鎖可変ドメインおよび/または重鎖可変ドメインである。典型的には、該キメラ抗体は軽鎖可変ドメイン及び重鎖可変ドメインを具備している。前記の非免疫グロブリン領域は、この抗原結合領域のC末端に融合される。この非免疫グロブリン領域は、典型的には非免疫グロブリンタンパクであり、酵素領域、公知の結合特異性を有するタンパク由来の領域、タンパク毒素由来の領域、または遺伝子によって発現される何れかのタンパクに由来する領域であり得る。この非免疫グロブリン領域は難溶領域であってもよい。該キメラ抗体の二つの領域は、開裂可能なリンクアーリングを介して連結され得る。

軽鎖CDR1～3(配列ID番号3～8)および重鎖CDR1～3(配列ID番号11～16)は、抗ヒトT細胞抗体YTH655(5)6のCDRである。このYTH655(5)6はラットIgG2bモノクローナル抗体であり、ヒトCD2を導入されたトランスジュニッカマウス由来の休止T細胞および活性化T細胞に結合し、該T細胞の増殖を阻害し、該T細胞を溶解する。ヒト化YTH655抗体の特異性は、ヒトCD2を

導入されたトランスジュニッカマウス由来の休止T細胞および活性化T細胞に結合し、該T細胞の増殖を阻害し、且つ該T細胞を溶解する能力によって決定され得る。

ヒト化抗体のCDRは、適切には上記の軽鎖CDR1～3および重鎖CDR1～3である。しかし、これらCDRのアミノ酸配列は変更され得る。各CDRのアミノ酸配列は、アミノ酸の置換、導入および/または削除によって最大40%まで(例えば30%まで、20%まで若しくは10%まで)変更され得る。

従って、夫々のCDRには、アミノ酸の置換、導入および/または削除が一つ又は二つ含まれ得る。軽鎖CDR3または重鎖CDR3には、アミノ酸の置換、導入および/または削除が三つまで存在し得る。軽鎖CDR1には、アミノ酸の置換、導入および/または削除が四つまで存在し得る。重鎖CDR2には、アミノ酸の置換、導入および/または削除が六つまで存在し得る。好ましくは、各CERのアミノ酸配列は、抗T細胞抗体YTH655(5)6における各CDRのアミノ酸配列に対して実質的な相同意を有している。

当該抗体のフレームワーク及び定常ドメインは、ヒト・フレームワーク及びヒト定常ドメインである。好ましくは、抗体重鎖における可変ドメインのフレームワークは、ヒト・タンパクKOLの対応するフレームワーク(Schmid et al., *Biopolymers*, 2, 197-211, 1983)に対して実質的な相同意を有している。フレームワークに関するKOLとの相同意は、一般に80%以上(例えば90%以上

## 特表平7-504808 (4)

または95%以上)である。アミノ酸の置換、挿入および/または削除が数多く存在し得る。例えば、フレームワーク4の第七残基は適切にはThr又はLeu、好みしくはLeuである。Table II (1987)によれば、この残基はKOLの残基109である。結合を修復するために成され得る他のフレームワーク変更には、アミノ酸残基27, 30, 48, 66, 67, 71, 91, 93及び94が含まれる。アミノ酸のナンバリングはTable IIに従う。

抗体軽鎖における可変ドメインのフレームワークは、典型的には、タンパク85(GVII)の可変ドメイン・フレームワーク(EMBLデータベース: Table, B.6., EMBL Data Library submitted 7/1/1987, 1988)に対して実質的な相同意を有している。この配列には452位にフレームシフトが存在する。読み取り枠(reading frame)を修正するために、塩基452(T)の削除がなされた。フレームワークに関するGVIIとの相同意は、一般に80%以上(例えば90%以上または95%以上)である。例えば、Table IIのナンバリングに従ったアミノ酸残基-TIにおけるように、アミノ酸の置換、挿入および/または削除が数多く存在し得る。

ヒト化抗体は、本発明に従う方法によって製造される。この方法は、ヒト化抗体の重鎖をコードする第一発現ベクター並びにヒト化抗体の重鎖をコードする第二発現ベクターで形成転換された宿主を、矢々の鎖が発現される条件下で維持することと、こうして発現された鎖の組み立てによって形成されたヒト化抗体を単離することを具備する。

第一および第二の発現ベクターは同じベクターであり得る。更に、本発明は次のものを提供する。

- ・ヒト化抗体の軽鎖または重鎖をコードする配列を有するDNA。
- ・前記DNA配列を組み込んだ発現ベクター。
- ・前記発現ベクターで形質転換された宿主。

抗体の矢々の鎖は、CDR置換によって製造され得る。得られた抗体が休止T細胞および活性化T細胞に結合できるよう、ヒト抗体の軽鎖または重鎖における可変ドメインのCDRが、YTH-655の矢々のCDRの充分なアミノ酸配列によって置換される。ヒト抗体鎖の可変領域をコードするDNAのCDRコード領域が、望ましいCDRをコードするDNAによって置き換える。適切な場合には、この変異DNAは抗体鎖の定常ドメインをコードするDNAに連結される。該DNAは発現ベクター中にクローニングされる。この発現ベクターは適合する宿主細胞中に導入され、該細胞は抗体鎖が発現されるような条件下で培養される。この方法で同時に発現された複数的な抗体鎖は、次いで組み立てられ、ヒト化抗体が形成され得る。

モノクローナル抗体をヒト化するための四つの一般的ステップが存在する。即ち、

(1) 出発抗体の軽鎖および重鎖における可変ドメインのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を決定すること。

(2) ヒト化抗体を設計すること、即ち、ヒト化プロセスの際に何れの抗体フレームワークを使用するかを決定すること

と。

### (3) 現実のヒト化方法論/技術

### (4) トランسفエクション及びヒト化抗体の発現。

#### <ステップ1>

##### 抗体の軽鎖および重鎖における可変ドメインのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列の決定

抗体をヒト化するためには、抗体の重鎖および軽鎖における可変領域のみが必要であることが知られている。定常ドメインの配列は、再構成ストラテジーに寄与しないので関係がない。抗体の可変ドメインにおけるアミノ酸配列を決定する最も単純な方法は、重鎖および軽鎖の可変ドメインをコードするクローニングされたcDNAから決定することである。

与えられた抗体の重鎖および軽鎖における可変ドメインのcDNAをクローニングするためには、二つの一般的方法がある。即ち、(1) 従来のcDNAライブラリーを介する方法、または(2) ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を介する方法である。これらの方針は、両者共に広く知られている。該cDNAのヌクレオチド配列が与えられれば、この情報を、抗体可変ドメインの推定アミノ酸配列に翻訳することは簡単なことである。本発明の例において、ゲッブルYTH-655抗体のヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列は、配列ID番号1および2(軽鎖)、並びに配列ID番号9および10(重鎖)に示されている。

#### <ステップ2>

#### ヒト化抗体の設計

ヒト化に際して何れのヒト抗体配列を使用するかを決定する場合、考慮すべき幾つかの因子が存在する。軽鎖および重鎖のヒト化は相互に独立して考慮されるが、矢々についての勘案は基本的には同様である。

この選別プロセスは次の論理に基づいている。即ち、与えられた抗体の抗原特異性および抗原親和性は、主に可変ドメインにおけるCDRのアミノ酸配列によって決定される。可変ドメインのフレームワーク残基による直接の寄与は、極めて小さいか、或いは全くない。フレームワーク領域の主要な機能は、該のCDRを、抗体を認識するための適切な空間的配向(exposition)で保持することである。従って、ヒト可変ドメインのフレームワークがゲッブルの可変ドメイン(ゲッブルCDRの起源)に対して高度の相同意を有しているならば、ゲッブルのCDRをヒト可変ドメインのフレームワーク中に置換することが、その正しい空間的配向を最も保持し易いように思われる。従って、ヒト可変ドメインは、ゲッブルの可変ドメインに対して高度の相同意を有するように、好ましく選択されなければならない。

適切なヒト抗体の可変ドメイン配列は、次のようにして選択される。

1. コンピュータ・プログラムを用いることにより、ゲッブル抗体の可変ドメインに対して最も相同意の高いヒト抗体の可変ドメイン配列について、全ての入手可能なタンパク(およびDNA)のデータベースを調査する。適切なプログ

## 特表平7-504808 (5)

ラムの出力は、ゲッセ類抗体に対して最も相間性の高い配列、各配列に対する相間性パーセント、およびゲッセ類配列に対する各配列の整列に関するリストである。これは、重鎖および軽鎖の両方の可変ドメイン配列について独立に行なわれる。ヒト免疫グロブリンの配列のみが含まれているとすれば、上記の分析はもっと容易に達成される。

2. ヒト抗体における可変ドメインの配列を列記し、相間性を比較する。最初に、CDRの長さ（変化が著しい重鎖のCDR3を除く）を比較する。ヒトの重鎖、並びにカッパ軽鎖およびラムダ軽鎖をサブグループに分割する；重鎖は3つのサブグループ、カッパ鎖は4つのサブグループ、ラムダ鎖は6つのサブグループである。CDRの寸法は、各サブグループ内では同様であるが、サブグループ間では変化する。ゲッセ類抗体のCDRを、相間性の一次近似として、ヒト・サブグループの一つに適合させることができると通常は可能である。次いで、同様の長さのCDRを有する抗体が、アミノ酸配列の相間性について比較される。この比較は、特にCDR内において行なわれるが、周囲のフレームワーク領域においても行なわれる。最も相間性の高いヒト可変ドメインが、ヒト化のためのフレームワークとして選ばれる。

### <ステップ3>：

#### 現実のヒト化方法論／技術

EP-A-0339400 に従い、所望のCDRをヒト・フレームワークにグラフトすることによって、抗体はヒト化され得る。従って、所望の再構成された抗体をコードするDNA配

列は、そのCDRを再構成しようとするヒトDNAを用いて開始することにより作製され得る。所望のCDRを含むゲッセ類の可変ドメインにおけるアミノ酸配列が、選択されたヒト抗体の可変ドメイン配列と比較される。ヒト可変領域にゲッセ類CDRを組み込むために、ゲッセ類の対応残基に変える必要があるヒト可変ドメイン残基がマークされる。また、ヒト配列中の置換すべき残基、該配列に追加すべき残基または該配列から削除すべき残基も存在し得る。

ヒト可変ドメインを突然変異化して所望の残基を含ませるために用いることができるオリゴヌクレオチドが合成される。これらオリゴヌクレオチドは、何れか部分のよい大きさとすることができる。通常は、入手可能な特定の合成機で合成可能な長さにおいてのみ制限される。オリゴヌクレオチドに指令されたイン・ピトロでの突然変異誘発法は、広く知られている。

或いは、WO 91/01075 の組換ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）を用いてヒト化を達成してもよい。この方法論を用いると、ヒト抗体のフレームワーク領域の間のCDRがスライスされる。

一般に、英国特許出願第9022011.2号の技術は、二つのヒト・フレームワーク領域（A B および C D）並びにその間のCDR（ドナーCDRによって置換されるべきもの）を具備したテンプレートを用いて行なわれる。プライマーAおよびプライマーBはフレームワーク領域A B を増幅するために用いられ、プライマーCおよびプライマーDはフレームワーク

領域C Dを増幅するために用いられる。しかし、プライマーBおよびプライマーCの夫々の5'末端には、ドナーCDR配列の全部または少なくとも一部に対応した追加の配列が含まれている。プライマーBおよびプライマーCは、PCRが行なわれ得る条件下において、これらの5'末端が相互にアニールされるに充分な長さで重なる。従って、増幅された領域A B および C Dは、オーバーラップおよび伸長による遺伝子スプライシングを受け、単一の反応でヒト化された生成物が製造される。

### <ステップ4>：

#### トランسفエクションおよび再構成抗体の発現

抗体を再構成するための突然変異誘発反応に続いて、変異誘発されたDNAは、軽鎖または重鎖の定常ドメインをコードする適切なDNAに連結され、発現ベクター中にクローニングされ、宿主細胞（好ましくは哺乳類細胞）中にトランسفエクトされ得る。これらのステップは、常法に従って行なうことができる。従って、再構成抗体は下記（a）～（d）を具備したプロセスによって製造され得る：

（a）1gの重鎖または軽鎖の少なくとも可変ドメインをコードするDNA配列に操作可能に連結された適切なプロモータを含み、該可変ドメインがヒト抗体由来のフレームワーク領域および本発明のヒト化抗体に要求されるCDRを具備する、第一の復製可能な発現ベクターを調製すること。

（b）相補的1gの軽鎖および重鎖の少なくとも可変ドメインを夫々コードするDNA配列に操作可能に連結された適

切なプロモータを含む、第二の復製可能な発現ベクターを調製すること。

（c）細胞ラインを、上記で調製された第一のベクターまたは両方のベクターで形質転換すること。

（d）前記形質転換された細胞ラインを培養し、前記変異抗体を製造すること。

好ましくは、ステップ（a）におけるDNA配列は、ヒト抗体族の該可変ドメインと、該定常ドメイン又は夫々の定常ドメインとの両方をコードする。このヒト化抗体は回収され、精製され得る。変異抗体を産生するように形質転換された細胞ラインは、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞ライン、または不死化された哺乳類細胞ライン（中でもミエローマ、ハイブリドーマ、トリオーマ（tumor）またはクラッドローマ（cladroblastoma）細胞ラインのようないんパ起源のものが有利）であり得る。この細胞ラインはまた、ウイルス（例えばエブスタインバーウィルス）での形質転換により不死化されたB細胞のような、正常なリンパ球であってもよい。最も好ましくは、この不死化された細胞ラインはミエローマ細胞ライン又はその誘導体である。

ヒト化抗体の製造に用いられる細胞ラインは好ましくは哺乳類細胞ラインであるが、その代わりに、他の何れかの適切な細胞ライン、例えばバクテリア細胞ライン又は酵母細胞ラインを用いてもよい。單一の抗体鎖については、L cell由来のバクテリア株を用い得ることが予想される。得られた抗体は機能をチェックされる。もし機能が喪失していれば、ス

## 特表平7-504808 (6)

チャプ(2)に戻って抗体のフレームワークを変更する必要がある。

発見された本発明の全抗体、その二量体、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形は、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等のような当該技術における標準的な手法（一般には、Singer, L., Peleis Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982) を参照のこと）に従って精製することができる。薬剤としての用途に使用するためには、少なくとも約90%～95%の均一性をもった実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、98%～99%以上の均一性をもつものが最も好ましい。部分的に又は所望の均一さにまで精製されたら、ヒト化抗体は治療的に用いられ、或いは免疫蛍光染色等の試験操作の開発および実施に用いられる（一般には、Immunological Methods, Vol. I and II, Litton and Ferrier, eds., Academic Press, New York, N.Y. (1979 and 1981) を参照のこと）。

ヒトT細胞抗原特異性の抗体の典型的な用途は、T細胞に媒介された疾患状態の治療にある。一般に、疾患に関する細胞がT細胞抗原を有するものであると同定された場合は、該T細胞抗原に結合できるヒト化抗体が適切である。例えば、治療に適した典型的な疾患状態には、心臓、肺、腎臓、肝臓等の臓器移植を受けた患者における移植/宿主病および移植拒絶が含まれる。他の疾患には自己免疫疾患、例えば1型糖尿病、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、全身性紅斑狼瘡

および重症筋無力症が含まれる。

本発明のヒト化抗体はまた、他の抗体と組み合わせて、特に、疾患の原因細胞表面の他のマーカーと反応するヒトモノクローナル抗体と組み合わせて使用される。適切なT細胞マーカーには、例えば、第1回国際白血球分化ワークショッピングにより命名された、所謂「分化群(Clusters of Differentiation)」に分類されたものが含まれる(Lymphocyte Typing, Leiberman, et al., Eds., Springer-Verlag, N.Y. (1984))。

この抗体はまた、化学療法剤または免疫抑制剤と関連して別途投与される組成物としても使用される。典型的には、この薬剤には、シクロスボリンAまたはブリン類似体（例えばメソトレキセート、6-メルカバントイン等）が含まれるが、それ以外にも、当業者に周知の多くの薬剤（例えばシクロホスファミド、プレドニゾン等）もまた用いられる。

本発明の抗体は免疫毒素の一部を形成する。免疫毒素は二つの成分によって特徴づけられ、イン・ピトロまたはイン・ビブにおいて、選択された細胞を死滅させるために特に有用である。一つの成分は細胞毒素であり、通常、これを付着したまま吸収した細胞は死に至る。「デリバリー抗体」として知られる第二の成分は、毒素剤を特定の細胞タイプ、例えば癌細胞を構成する細胞へ運ぶための手段を提供する。この二つの成分は、普通は、種々の周知の化学的手法の何れかによって一緒に結合される。例えば、細胞毒剤が蛋白であり、第二成分が完全な免疫グロブリンであるとき、この結合はヘテロ二官能架橋剤（例えばSPDP、カルボジイミド、グル

タルアルデヒド等）によって行なわれ得る。当該技術において種々の免疫毒素が周知であり、例えば「モノクローナル抗体／毒素複合体：魔術の弾丸を目指して」（Therpe, et al., Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, pp. 168-190 (1982)）中に見出しができる。

免疫毒素としての用途に適した種々の細胞毒剤がある。細胞毒剤には、放射性鉄錆（例えばヨウ素-131、イットリウム-190、レニウム-188及びビスマス-213）；多くの化学療法剤（例えばビンデジン、メソトレキセート、アドリアマイシン及びシスプラチン）；細胞毒タンパク（例えばポークヴィード抗ウイルスタンパク、シェードモナスエキソトキンA、リシン、ジフテリア毒素、リシンA鎖等のようなりボソーム阻害タンパク、或いはホスホリバーゼ酵素（例えばホスホリバーゼC）のような細胞表面で活性なタンパク）が含まれる。一般的には、「キメラ毒素」（Oliver, et al., Nature, 281: 335-338 (1980)）並びに「癌の検出および治療のためのモノクローナル抗体」（ols, Biology and Biotech., p. 159-179, 224-266, Academic Press (1985)）を参照されたい。

免疫毒素のデリバリー成分は、本発明によるヒト化抗体である；完全な免疫グロブリン又はFabのようその結合性フラグメントが好ましく用いられる。典型的には、免疫毒素における抗体は、ヒトIgA、IgMまたはIgGアイソタイプであろうが、所望に応じて他の哺乳類正常ドメインが利用され得る。

本発明は更に、許容的に許容され得るキャリアまたは移転剤と、活性成分としての本発明によるヒト化抗体とを含有する薬剤組成物を提供する。この組成物は、本発明に従う免疫毒素を含有してもよい。本発明のヒト化抗体、免疫毒素およびその薬剤組成物は、非経腸的投与（即ち皮下投与、筋肉内投与または静脈内投与）に特に有用である。

非経腸的投与のための組成物は共通して、許容可能なキャリア（好ましくは水性キャリア）中に溶解された抗体の溶液またはそのカクテルからなっている。種々の水性キャリア（例えば水、緩衝水、0.4%生理食塩水、0.4%グリシン等）を使用することができる。これら溶液は滅菌されており、また一般には粒子物質を含まない。これら組成物は、従来周知の滅菌技術によって滅菌され得る。該組成物は、生物学的条件に近似させるために必要とされる、pH調節および緩衝剤、容積調節剤等のような薬剤的に許容可能な任意成分、例えば酢酸ナトリウム、堿化ナトリウム、堿化カリウム、堿化カルシウム、乳酸ナトリウム等を含有してもよい。これら处方中の抗体濃度は、例えば、約0.5重量%未満から、通常は約1重量%以上、最大で1.5重量%または2.0重量%までと広範に変化させることができ、選択された投与方法に従い、主に液体容量、粘度等に基づいて選択される。

筋肉注射のための典型的な薬剤組成物は、1mlの滅菌緩衝水および50mgの抗体を含有するように調製することができる。静脈注射のための典型的な薬剤組成物は、250mlの滅菌リングル溶液および150mgの抗体を含有するように

特表平7-504808 (7)

調製することができる。非経緯的に投与可能な組成物を調製するための実際の方法は、当業者にとっては公知もしくは明らかであり、例えば *Freigle's Pharmaceutical Science*, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980) の中により詳細に説明されている。

本発明の抗体は凍結乾燥して貯蔵し、使用に先立って、適切なキャリア中で再生することができる。この技術は、従来の免疫グロブリンについて有効であることが示されている。適切な凍結乾燥および再生技術は何れも用いることができる。当業者は、凍結乾燥および再生によって種々の程度での抗体活性の喪失がもたらされ（例えば、従来の免疫グロブリンでは、IgM抗体はIgG抗体よりも活性喪失が大きくなる傾向がある）、使用レベルを調節して補償しなければなければならないことを理解するであろう。

本発明のヒト様抗体を含有する組成物またはそのカクテルは、予防および/または治療のために投与され得る。治療的適用において、組成物は、既に疾患に罹患している患者に対し、該疾患およびその合併症を治療し、または少なくとも部分的に抑制もしくは緩和するために充分な量で投与される。これを達成するのに充分な量は、「治療的有效投与量」と定義される。この用途のための有効量は、感染の潜伏度および患者自身における免疫系の一般状態に依存するが、一般的には1回の投与量当たりの抗体量は約1～約200mgであり、より普通には患者当たり5～25mgの投与量が用いられる。本発明の物質は一般に、深刻な疾病状態、即ち生命が脅かさ

れ若しくは生命が脅かされる可能性のある状態に用いられることに留意しなければならない。このような症例においては、外因性物質を最小限とし、また「外来物質」拒絶の可能性を低減する（これは本発明のヒト様抗体によって達成される）という観点から、実質的に過剰量のこれら抗体を投与することが可能であり、また主治医はそれを望ましいと思うかも知れない。

予防的適用において、本発明の抗体を含有する組成物またはそのカクテルは、患者の抵抗力を高めるために、未だ疾患自体にない患者に投与される。このような投与量は「予防的有效投与量」と定義される。この用途においても、精密な量は患者の健康状態および免疫の一般的レベルに依存するが、一般的には1回の投与量当たりの抗体量は0、1～25mgの範囲であり、特に患者当たり0、5～2、5mgの投与量が用いられる。好ましい予防的用途は、腎臓移植拒絶の防止である。

当該組成物の一回投与または多回散投与は、主治医が選択した投与量レベルおよびパターンで行なわれる。何れにしても、薬剤処方は、患者を効果的に治療するために充分な量の本発明の抗体を与えなければならない。

本発明のヒト様抗体は更に、イン・ビトロにおける広範な有用性を有し得る。例を挙げると、典型的な抗体は、T細胞をタイピングするため、特異的YTH 655抗原を有する細胞または膜受容体のフラグメントを単離するため、並びにワクチンの製造等のために利用することができる。

診断目的において、当該抗体はラベルされてもよく、或いはラベルされなくてもよい。ラベルされない抗体は、並ヒトか抗体と反応するラベルされた他の抗体（第二抗体）、例えばヒト免疫グロブリンの正常領域に特異的なラベルされた抗体と組み合わせて用いることができる。或いは、該抗体を直接ラベルすることもできる。放射性標識、蛍光体、酵素、酵素基質、酵素共因子、酵素阻害剤、リガンド（特にハプテン）等のような広範なラベルが使用され得る。多種類の免疫検定が利用可能であり、これら免疫検定は当業者に周知である。

細胞活性に対する保護、または細胞活性もしくは選択された抗原の存在の検出において、本発明の抗体と共に使用するためのキットも提供される。即ち、本発明のヒト化抗体は、単独または所望の細胞タイプに特異的な追加の抗体と共に、通常は容器内の凍結乾燥された形態で提供されてもよい。抗体は、ラベルまたは素索に結合されても結合されなくてもよい。また、該抗体は蛋白波（例えばトリス緩衝波、リン酸緩衝波、炭酸緩衝波等）、安定剤、殺菌剤、不活性タンパク（例えば血清アルブミン）等の、および使用説明書のセットと共にキットに含められる。これらは、活性抗体の量を基準にして、一般的には約5重量%未満、通常は全量で少なくとも約0.001重量%で存在せしめる。しばしば、活性成分を精製するための不活性な増量剤または賦形剤を含めるのが望ましく、その場合、該影剤は全組成物の約1～99重量%で存在せしめる。当該キメラ抗体に結合できる第二抗体を試験または検定に用いる場合、通常はこれを別の瓶に収容する。

この第二抗体は典型的にはラベルに結合され、上記の抗体处方と同様にして処方される。

図 1 :

M 14 細胞に対するヒト化 YTH 655 の結合

ヒト化 YTH 655 (HUMCD2) の活性が、M 14 と称する活性化 T 細胞ラインを用いた PACS によって試験された。ヒト IgG<sub>1</sub> の定常ドメインおよび YTH 655 の可変ドメインを含むキメラ YTH 655 (CHIMCD2) が、对照として用いられた。細胞は先ず、キメラ YTH 655 またはヒト化 YTH 655 と共にインキュベートされた。洗浄の後、細胞は商場的に入手可能な抗ヒト FITC と共にインキュベートされ、次いで FACS (fluorescence activated cell sorting) によって分析された。図は、ヒト化 YTH 655 の結合性がキメラ YTH 655 の結合性と等価であること、並びにヒト化 YTH 655 の結合が力価測定され得ることを示している。從って、ヒト化モノクローナル抗体の抗原特異性は維持されていた。

## 特表平7-504808 (8)

以下の実施例は、本発明を例示するものである。

### YTH 655抗体由来のクローニングと配列決定

YTH 655抗体のVH領域をコードするcDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に基づく方法(Orlani et al., PNAS USA, 86:3833-3837, 1989)をいくらか変更した方法を用いて単離した。全RNAが、ゲアニジンチオシアニート法(Chang et al., Biochemistry, 18:5294, 1979)によってハイブリドーマ細胞から単離された。また、ポリ(A)+RNAは、全RNAをポリUセファロース4Bカラム(Pharmacia, Wiltshire, U.K.)に通し、溶出させることにより単離された。第一鎖を合成するために、5μgのポリ(A)+RNAを、250μMの各dNTP、10mMのジオヌレイトール、50mMのトリスHCl(42°CでpH8.2)、10mM・MgCl<sub>2</sub>、100mM・KCl、10ピコモルのV<sub>H</sub>ドメインに対して特異的なプライマー-VH<sub>H</sub>FOR [5'-d(TGA CGA GAC CGT GAC CCG CCG GGT CCC TGC CCC CGA G]、およびジエチルビロカルボネート(DEPC)処理した蒸留水と合体し、24μlとした。これを70°Cで10分間加熱し、その後42°Cで10分間加熱した後、23単位のスーパーレトロバスター(AMV逆転写酵素; Amgen Biotech, Cambridge, MA)を加えた。これを42°Cで1時間反応させた。

引き続くPCR増幅において、50μlのPCR増幅反応液は、5μlの第一鎖合成反応液(未精製)、500μMの各dNTP、67mMのトリスHCl(25°CでpH8.8)

、17mM・NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>、10mM・MgCl<sub>2</sub>、20μg/mlのゼラチン、5単位のTaq-DNAポリメラーゼ(Techne-PHC-1プログラムサイクリックリニアーカー)を用いて、95°Cで1.5分間(変性)、50°Cで3分間(アニーリング)および72°C3分間(伸長)のサイクルで30サイクル反応させた。最後のサイクルには、10分間の伸長時間を含めた。

サンプルを-20°Cで凍結し、ミネラル油(-20°Cで粘性的液体)を吸引で除去した。水相を解凍し、2%アガロース電気泳動した後、350bpのPCR生成物を精製した。このPCR生成物を、Pst I及びBam H Iの二つで切断した。当初、これをベクターM13VH-PCR1(Orlani et al., 1989)のPst I及びBam H I制限部位にクローニングした。しかし、作成したクローンの配列をジデオキシチーンタミネーション法(Sanger et al., PNAS USA 74:5463-5467, 1977)で調べたところ、YTH 655 VH遺伝子は、CDR<sub>2</sub>とCDR<sub>3</sub>の間のフレームワーク領域に位置した内部Pst I制限部位を含むことがわかった。代りのクローニング方法として、該PCR生成物をPst Iのみで消化し、M13mp18(Tischfield-Perrini et al., Gene 33:103-119, 1985)のPst I部位にクローニングした。純

いて、M13mp18からPst Iフラグメントを単離し、これをM13VH-PCR1(VHPst I-Bam H Iフラグメントを含む)のPst I部位にクローニングすることにより、完全なVH遺伝子を再構築した。Pst Iフラグメントの正確な配置(resolution)は、ジデオキシ配列分析によって決定された。最後に、YTH 655 VH遺伝子が内部Pst I部位を一つだけ含むこと(即ち、既存のローニング方法の結果としてDNAがまったく失われていないこと)を確かめるために、該部位を含む60bpフラグメントがクローニングされ、配列が決定された。この60bpのフラグメントは、VH-PCR生成物をXba I-Bgl IIで2重切断し、次いでM13mp19のHinc II-Bam H I部位にクローニングすることによって生じた。

独立のPCR増幅で得たランダムなVH-PCR生成物のスクレオチド配列分析、並びに独立のRNA分離によって、单一のVHドメインcDNAが明らかになった。cDNAの配列と推定アミノ酸配列については後述する。VH領域をコードするDNAのクローニングは見つからなかったので、この配列は、YTH 655抗体遺伝子に由来するものと思われる。

### YTH 655抗体のVH領域のクローニングと配列決定

ハイブリドーマ細胞からの全RNAが、ゲアニジンチオシアニート法(Chang et al., Biochemistry, 18:5294, 1979)によって単離された。全RNAからmRNAを抽出するためには、ダイナビーズオリゴ(dT)<sub>20</sub>(Dynal社)が、既

述業者のプロトコルに従って用いられた。

cDNA合成用スーパースクリプトプラスミドシステム及びプラスミドクローニングのためのキット(BRL社)を用い、製造業者の推薦する方法に従って、単離したmRNAからcDNAを合成し、これをプラスミドpSPORT-1にクローニングした。その結果得られたcDNA/pSPORT-1ライゲーション生成物により、大脳腫瘍HeLa细胞(D555 Clonal Cell; BRL社)が形質転換された。約5,000コロニーがハイポンドナイロンフィルター(Amersham)上に載置され、Belvels et al.(Nucleic Acids Res. 17:451, 1989)の方法に従って溶解し、酸性して固定した。フィルターを55°Cで30分間、0.2×SSC、0.1%SDS中のプロテナーゼK(50μg/ml)で処理し、過剰の残渣をティッシュで除去した。

短縮し放しに関するM13ファージ上清が、フィルターをスクリーニングするプローブを作製するために用いられた。このM13ファージ上清は、M13のリバースプライマー及びユニバーサルプライマー、並びに2μlの<sup>32</sup>P-ATPを用いることにより、PCR反応にかけられた。フィルターは、Cherel et al.(1991-1995, 1992)の方法(EP 81, 1991-1995, 1992)に従い、ハイブリッド形成浴液中において、25μlの放射活性プローブを用いてスクリーニングされた。略30の潜在的陽性のコロニーが検出された。陽性クローンから、Belvels らの方針(Nucleic Acids Research 17:451, 1989)を用いて、プラスミドDNAが調製された。このDNAを、Nod 1およ

特表平7-504808 (8)

*DS* = *I*Iで制限分解した後、既述の  $^{32}P$ -M13 ファージ上清プローブを用いたサザンプロットにより分析した。4つの中性クローンの配列が、T7、T3、及びフレームワーク4プライマーを使って、ジデオキシチューンクーミネーション法 (Sanger et al., PNAS USA 74, 5463-5467, 1977) に従って決定された。3つのクローンは短鎖型 YTH 655 抗体 L 鎮であり、1つのクローンは完全な長さの YTH 655 抗体 L 鎮であった。完全な長さのクローンは、ジデオキシチューンターミネーション法を用いて配列が完全に決定された。

キメラ抗体の検討

前述のステップ2で説明した選別方法を用いることにより、KOL血漿 (Kabat et al., 1987) のヒト可変領域フレームワークと、HSICKVII型（EMBLデータベース；1986年4月7日に提出された Kabat, H.G. EMBLデータライブリリー）がヒト化プロセスのために選ばれた。

ヒト化したH鎖とL鎖遺伝子の構造

ヒト化したH鎖とL鎖は、次の Loris 和 Cruse (Gene 101, 297-302, 1991) の方法にしたがって精算された。

(1) L鎖

- ・ L鎖オリゴヌクレオチドプライマー
- A<sub>L</sub> : 配列 ID番号 17 :
- B<sub>L</sub> : 配列 ID番号 18 :
- C<sub>L</sub> : 配列 ID番号 19 :
- D<sub>L</sub> : 配列 ID番号 20 :

PCR反応 (Sanger et al., Science 239, 487-491, 1988) が、プログラム可能なヒーティングブロック (Bioblock) 中において、温度サイクル (94°Cで1分30秒、50°Cで2分、72°Cで3分) を20サイクル繰り返した後、最後に72°Cで10分保持することにより行われた。製造業者が推奨するように、800ngの各プライマー、特定量の酵型、および2.5単位の Taq ポリメラーゼ (Perkin Elmer Cetus) を、反応液瓶と共に100μlの最終容量とした。

このPCRのための最初の酵型は、先にヒト化された H-DIGI L鎖であった。これは、HSICKVIIフレームワークを有するヒト・カバレ鎖であり、統一的部位指向性突然変異を受けて、CDRL1、CDRL2 および CDRL3 をラップト抗ジゴキシンモノクローナル抗体 (D14B) の CDRL1、CDRL2 および CDRL3 に置き換えたものである。

最初に、4つの一次PCR反応が行なわれた。夫々の反応は、1.0ngの酵型と各プライマー対、即ち A<sub>L</sub> と B<sub>L</sub> とのプライマー対、C<sub>L</sub> と D<sub>L</sub> とのプライマー対、E<sub>L</sub> と F<sub>L</sub> とのプライマー対または G<sub>L</sub> と H<sub>L</sub> とのプライマー対とを使って行なわれた。これらPCR反応の生成物、即ち、夫々のフラグメント ABL<sub>L</sub>、CDL<sub>L</sub>、EFL<sub>L</sub> および GLH<sub>L</sub> は、Pre-p-A-Gene (Biobrad) を用いて、生産者が推奨するブ

ロトコルに従って精製された。各精製物の1/4を使って、フラグメント ABL<sub>L</sub> と CDL<sub>L</sub>、並びにフラグメント EFL<sub>L</sub> と GLH<sub>L</sub> を夫々結合した。この夫々について、プライマー A<sub>L</sub> 及び D<sub>L</sub>、またはプライマー E<sub>L</sub> 及び H<sub>L</sub> を用いた組換えPCR反応を行った。これらの反応生成物、即ちフラグメント ABL<sub>L</sub> およびフラグメント EFL<sub>L</sub> を上記のように精製し、これら夫々の生成物の1/4を、プライマー A<sub>L</sub> および H<sub>L</sub> を用いた組換えPCR反応において結合させた。最終的なヒト化L鎖組換えPCR生成物 (即ち AH<sub>L</sub>) は、(Kabat et al., 1991) の方法に従って、プライマー A<sub>L</sub> および H<sub>L</sub> における Hind III 部位を利用して、プラスミド pUC-18 (BR<sub>L</sub>) の Hind III 部位にクローニングされた。ジデオキシチューン末端法を用いることにより、単離したプラスミドの配列を決定し、正しい配列のクローンを選択した。

(2) H鎖

- ・ H鎖オリゴヌクレオチドプライマー
- A<sub>H</sub> : 配列 ID番号 25 :
- B<sub>H</sub> : 配列 ID番号 26 :
- C<sub>H</sub> : 配列 ID番号 27 :
- D<sub>H</sub> : 配列 ID番号 28 :
- E<sub>H</sub> : 配列 ID番号 29 :
- F<sub>H</sub> : 配列 ID番号 30 :
- G<sub>H</sub> : 配列 ID番号 31 :
- H<sub>H</sub> : 配列 ID番号 32 :

PCRのための最初の酵型は、ヒト化抗CD4血漿 (K

OLフレームワーク上にある、T0 92/05274 (Germann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1971) で、ゲノムDNAからcDNAに転換されたものである。上記の組換えPCR法に従って、この酵型にゲッケン鎖のCDRがグラフトされた。ただし、このPCR法では、オリゴヌクレオチドプライマー A<sub>H</sub> ~ H<sub>H</sub> が用いられた。オリゴヌクレオチド A<sub>H</sub> および H<sub>H</sub> は、ヒト化可変領域の最初のクローニングを可能にするために、夫々 Hind III および EcoRI 部位で設計された。また、その後の選択された適切な定常領域を有する可変領域のクローニングを容易にするために、Spe I 部位が、オリゴヌクレオチド G<sub>H</sub> の KOLフレームワーク4 (FR4) 領域に導入された。この Spe I 部位は、ヒト化抗CD4-H鎖酵型の109番目 (ナンバリングは Kabat et al., 1987 による) のスレオニン残基 (KOLではプロリン) をロイシン残基 (6つのヒトH鎖) 遺伝子断片のうち4つがこの位置にロイシンを有する; Kabat et al., 1987) にかえた。ヒト化H鎖の可変領域組換えPCR生成物は、Hind III/EcoRIで切断したpUC-18 (BR<sub>H</sub>) 中にクローニングされ、正しい配列をもった単離プラスミドが選択された。ヒト化抗CD4血漿のFR4およびc'1定常領域が、オリゴヌクレオチドプライマー X<sub>H</sub> (配列 ID番号 33) および Y<sub>H</sub> (配列 ID番号 34) を用いて、pUC-18 (BR<sub>H</sub>) 中にPCRクローニングされた。プライマー X<sub>H</sub> は Spe I 部位および Hind III 部位を含み、Y<sub>H</sub> は EcoRI 部位を含んでいる。Hind III および EcoRI 部位を用いて、

特表平7-504808 (10)

配列表

PCR生成物がpUC-18中にクローニングされ、正しい配列をもった単離プラスミドが選択された。統いて、設計したPR4-Spe1部位を用いることにより、ヒト化可変領域クローンおよびY1定常領域クローンから、完全なDNAが再構築された。

ヒト化YTH655のH鎖とL鎖は、ヒトサイトメガロウイルスプロモーターに支配された真核生物発現ベクター中にクローニングされ、COS細胞内において、IgG-E LIS Aの測定では200ng/mlのレベルで一時的に発現された。ヒト化YTH655のH鎖およびL鎖を発現する安定な細胞ラインは、NSO細胞に、COS細胞のトランスフェクションに使ったのと同じ真核細胞発現ベクターをトランスフェクトすることによって作製された。YTH655、並びにヒトIgG1定常領域およびYTH655の可変領域を含むキメラYTH655は、活性T細胞ラインであるMF14に結合することがFACS分析によって示された。FACS (Weiz D.W. 1985 *Handbook of Experimental Immunology* Vol 1 and 2 411 Blackwell Scientific Publications, Oxford) で測定したとき、MF14細胞に結合するヒト化YTH655 [4μg/mg] は、ラットYTH655 [4μg/mg] およびキメラYTH655 [4μg/mg] の結合と等価であった。従って、ヒト化モノクローナル抗体の抗原特異性は保持されていた。FACS分析によって、ヒト化YTH655のMF14細胞への結合は濃度依存性であることが示された。

(1) 一般情報

(I) 出版人

(A) 名称：ウェルカム・ファウンデーション・リミテッド  
(B) 通り：ユニオンハウス、ユーストンロード 160  
(C) 市：ロンドン  
(D) 国：英国  
(E) 郵便番号 (ZIP) : NW1 2BP

(F) 氏名：ワルドマン、ヘルマン  
(G) 通り：ケンブリッジ大学、病理学部、免疫科  
(H) 市：チニスコートロード、ケンブリッジ  
(I) 州：ケンブリッジシャー  
(J) 国：英国  
(K) 郵便番号 (ZIP) : CB2 1QP

(L) 氏名：ウォルシュ、ルイス  
(M) 通り：ケンブリッジ大学、病理学部、免疫科  
(N) 市：チニスコートロード、ケンブリッジ  
(O) 州：ケンブリッジシャー  
(P) 国：英国  
(Q) 郵便番号 (ZIP) : CB2 1QP

(II) 発明の名称：抗体

(III) 配列の数：34

(1) コンピュータ読み取り可能な形態

- (A) 製本タイプ：フロッピーディスク
- (B) コンピュータ：IBM・PCコンパチブル
- (C) オペレーティングシステム：  
PC-DOS/MS-DOS
- (D) ソフトウェア：

PatentInfo Release 11.0, Version 11.25 (EPC)

(1) 先の出願データ

- (A) 出願番号：GB 91 25979.6
- (B) 出願日：1991年12月6日

(2) 配列ID番号1の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ：330 基塩対
- (B) 型：DNA
- (C) 鎖の数：二本鎖
- (D) トポロジー：直線状

(2) 分子の種類：cDNA

(3) 特徴

- (A) 特徴を表す記号：CDS
- (B) 位置：1…330

(1) 配列の記載：配列ID番号1

CAT CTT CTG ATG ACA CAA ACT CCA GTC TCC CGT GTC AGC CTT CGA	48
Asp Val Val Met Thr Glu Thr Pro Val Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly	
1 3 10 17 24 31 38 45 52 59 66 73	33
 CGT CAA CCC TCT ATC TGT TCC CGG TCA AGT CAG ACC CTC GTC AAC ACT	96
Gly Glu Ala Ser Ile Ser Ser Cys Arg Ser Ser Glu Ser Leu Val His Ser	
20 23 30 37 44 51 58 65 72 79 86 93	30
 AAT CGA AAC ACC TAC TTG CAT TGC TAC CTC CAG AAC CCA CGG CAC TCT	144
Asn Glu Asn Thr Tyr Leu His Tyr Tyr Leu Glu Lys Pro Glu Glu Ser	
35 42 49 56 63 70 77 84 91 98 105 112	33
 CCA TAC CTC ATC TAT CGG CTT TCC AAC ACA TTT TCT CGG CGG CCA	192
Pro Glu Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser-Gly Val Pro	
50 57 64 71 78 85 92 100 107 114 121	60
 GAC AGG TTC AGT CGG AGC TCA CGG ACA GAT TTC AGC CTC AAC ATC	240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
65 72 79 86 93 100 107 114 121 128 135	60
 ACC AGA CTA GAC CCT CAG GAC TTC CGG GAT TAT TAC TCC TTA CAA AGT	288
Ser Arg Val-Glu Asp Leu Cys Asp Tyr Ser Cys Leu Glu Ser	
85 92 99 106 113 120 127 134 141 148 155	93
 ACA CAT TTT CGG TAC ACC TTT CGA CCT CGG ACC AAC CTC GAA	330
Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Cys Ala Cys Thr Lys Leu Glu	
100 107 114 121 128 135 142 149 156 163 170	110

(2) 配列ID番号2の情報

(1) 配列の特徴

- (A) 長さ：110 アミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (C) トポロジー：直線状
- (D) 分子の種類：タンパク
- (E) 配列の記載：配列ID番号2

特表平7-504808 (11)

Asp Val Val His Thr Cln Thr Pro Val Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 3 10 15  
 Gly Cln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Cln Ser Leu Val His Ser  
 10 23 20  
 Asn Cln Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Cln Lys Phe Gly Cln Ser  
 33 40 43  
 Pro Cln Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 30 35 40  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 63 70 73 80  
 Ser Arg Val Cln Pro Glu Asp Leu Cln Asp Tyr Tyr Cys Leu Cln Ser  
 83 90 95  
 Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Cln Ala Cln Thr Lys Leu Cln  
 100 105 110

(2) 配列 I D番号 3 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ：48塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 頭の数：二本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の種類：c DNA

(iii) 特徴

- (A) 特徴を表す記号：CDS
- (B) 位置：1…48

(iv) 配列の記載：配列 I D番号 3

CCG TCA AGT CAC ACC CTG CTA CAC AGT AAT GCA AAC ACC TAG TTG CAT  
 Arg Ser Ser Cln Ser Leu Val His Ser Asn Cln Asn Thr Tyr Leu His  
 1 3 10 15

48

(2) 配列 I D番号 4 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ：16 アミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の種類：タンパク

(iii) 配列の記載：配列 I D番号 4

Arg Ser Ser Cln Ser Leu Val His Ser Asn Cln Asn Thr Tyr Leu His  
 1 3 10 15

(2) 配列 I D番号 5 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ：21塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 頭の数：二本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の種類：c DNA

(iii) 特徴

- (A) 特徴を表す記号：CDS
- (B) 位置：1…21

(iv) 配列の記載：配列 I D番号 5

GGG GTT TCC AAC AGC TTT TCT  
 Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 3

51

(2) 配列 I D番号 6 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ：1 アミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の種類：タンパク

(iii) 配列の記載：配列 I D番号 6

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 3

(2) 配列 I D番号 8 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ：9 アミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の種類：タンパク

(iii) 配列の記載：配列 I D番号 8

Leu Cln Ser Thr His Phe Phe Tyr Thr  
 1 3

(2) 配列 I D番号 7 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ：27塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 頭の数：二本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の種類：c DNA

(iii) 特徴

- (A) 特徴を表す記号：CDS
- (B) 位置：1…27

(iv) 配列の記載：配列 I D番号 7

TTC CAA AGT ACA CAT TTT CCC TAG ACC  
 Leu Cln Ser Thr His Phe Pro Tyr Thr  
 1 3

27

(2) 配列 I D番号 9 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ：297 塩基対
- (B) 型：核酸
- (C) 頭の数：二本鎖
- (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の種類：c DNA

(iii) 特徴

- (A) 特徴を表す記号：CDS
- (B) 位置：1…297

(iv) 配列の記載：配列 I D番号 9

特表平7-504808 (12)

GCA CCT TTG GTC AAA CCT GCG CCT TCT CTC AAA CTC TCT TGT GTC CGC Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Leu Ser Cys Val Ala 1 3 10 13	68	Cly Cly Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala 1 3 10 13
TGG CGA TTC ACT TTC ACT GAC TAC TGG ATG AGC TGG CGT CCC CAG ACT Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Glu Thr 20 23 30	96	Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Glu Thr 20 23 30
CCT CGA AAG ACC ATG GAG TGG ATT CGA GAT ATT AAA TAT GAT CGC ACT Pro Gly Lys Thr Met Glu Trp Ile Gly Asp Ile Lys Tyr Asp Gly Ser 33 40 43	144	Pro Gly Lys Thr Met Glu Trp Ile Gly Asp Ile Lys Tyr Asp Gly Ser 33 40 43
TAC ACA AAC TAT CGA CGA TCC CTA AAC AAT CGA TTC ACA ATC TCC AGA Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg 50 53 60	192	Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg 50 53 60
GAC AAT CGC AAG ACC CGC TAC CTG CAG ATG AGC AAT CGC AGA TCT Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Glu Met Ser Asn Val Arg Ser 63 70 73 80	230	Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Glu Met Ser Asn Val Arg Ser 63 70 73 80
CAG GAC ACA CGC ACT TAT TAG TCT ACT AGA GAC GYA CAA CGC ACT TAC Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Cys Thr Arg Glu Val Glu Arg Ser Tyr 85 90 93	268	Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Cys Thr Arg Glu Val Glu Arg Ser Tyr 85 90 93
TGG CGC CAA Trp Gly Glu	297	Trp Gly Glu

(2) 配列 ID 番号 10 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ：99 アミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (C) トポロジー：直鎖状
- (D) 分子の種類：タンパク
- (E) 配列の記載：配列 ID 番号 10

(2) 配列 ID 番号 12 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ：5 アミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (C) トポロジー：直鎖状
- (D) 分子の種類：タンパク
- (E) 配列の記載：配列 ID 番号 12

Asp Tyr Trp Met Ser  
1 3

(2) 配列 ID 番号 13 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ：51 構成基
- (B) 型：構成
- (C) 鎮の数：二本鎮
- (D) トポロジー：直鎖状
- (E) 分子の種類：c DNA
- (F) 特徴
- (G) 特徴を表す記号：CDS
- (H) 位置：1~51
- (I) 配列の記載：配列 ID 番号 13

GAT ATT AAA TAT GAT GCG ACT TAC ACA AAC TAT CGA CGA TCC CTA AAC  
Asp Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys  
1 3 10 13

AAT  
Asn

48

51

Cly Cly Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala 1 3 10 13	68	Cly Cly Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala 1 3 10 13
Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Glu Thr 20 23 30	96	Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Glu Thr 20 23 30
Pro Gly Lys Thr Met Glu Trp Ile Gly Asp Ile Lys Tyr Asp Gly Ser 33 40 43	144	Pro Gly Lys Thr Met Glu Trp Ile Gly Asp Ile Lys Tyr Asp Gly Ser 33 40 43
Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg 50 53 60	192	Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg 50 53 60
Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Glu Met Ser Asn Val Arg Ser 63 70 73 80	230	Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Glu Met Ser Asn Val Arg Ser 63 70 73 80
Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Cys Thr Arg Glu Val Glu Arg Ser Tyr 85 90 93	268	Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Cys Thr Arg Glu Val Glu Arg Ser Tyr 85 90 93
Trp Gly Glu	297	Trp Gly Glu

(2) 配列 ID 番号 11 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ：15 構成基
- (B) 型：核苷
- (C) 鎮の数：二本鎮
- (D) トポロジー：直鎖状
- (E) 分子の種類：c DNA
- (F) 特徴
- (G) 特徴を表す記号：CDS
- (H) 位置：1~15
- (I) 配列の記載：配列 ID 番号 11

GAC TAC TGG ATG AGC  
Asp Tyr Trp Met Ser  
1 3

13

(2) 配列 ID 番号 14 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ：17 アミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (C) トポロジー：直鎖状
- (D) 分子の種類：タンパク
- (E) 配列の記載：配列 ID 番号 14

Asp Ile Lys Tyr Asp Gly Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys  
1 3 10 13

Asn

(2) 配列 ID 番号 15 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ：18 構成基
- (B) 型：核苷
- (C) 鎮の数：二本鎮
- (D) トポロジー：直鎖状
- (E) 分子の種類：c DNA
- (F) 特徴
- (G) 特徴を表す記号：CDS
- (H) 位置：1~18
- (I) 配列の記載：配列 ID 番号 15

GAG GTA CGA CGC ACT TAC  
Glu Val Glu Arg Ser Tyr  
1 3

18

特表平7-504808 (18)

(2) 配列 I D番号 1 6 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 6 アミノ酸
- (B) 型 : アミノ酸
- (C) トポロジー : 直鎖状

(II) 分子の種類 : タンパク

(iii) 配列の記載 : 配列 I D番号 1 6

Glu Val Glu Arg Ser Tyr  
1            3

(2) 配列 I D番号 1 7 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 30塩基対
- (B) 型 : 桟駒
- (C) 繼の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(II) 分子の種類 : cDNA

(III) ハイボセティカル配列 : NO

(iv) アンチセンス : NO

(v) 配列の記載 : 配列 I D番号 1 7

CATGAACTT CCTCTACAGTT ACTGACCAACA

CCATTACTGT CTACCAACCT CTACTTGAC CGACAGCGAG TGGAGGC

47

(2) 配列 I D番号 1 9 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 47塩基対
- (B) 型 : 桟駒
- (C) 繼の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(II) 分子の種類 : cDNA

(III) ハイボセティカル配列 : NO

(iv) アンチセンス : NO

(v) 配列の記載 : 配列 I D番号 1 9

TGGTACACAG TAATGCCAAC ACCTACTTGC ATTTGTACCT GCAGAG

47

(2) 配列 I D番号 2 0 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 36塩基対
- (B) 型 : 桟駒
- (C) 繼の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(II) 分子の種類 : cDNA

(III) ハイボセティカル配列 : NO

(iv) アンチセンス : YES

(v) 配列の記載 : 配列 I D番号 2 0

ACAAAGATCT TTGGAAACCC CATACTACG CACCTG

(2) 配列 I D番号 2 2 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 42塩基対
- (B) 型 : 桟駒
- (C) 繼の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(II) 分子の種類 : cDNA

(III) ハイボセティカル配列 : NO

(iv) アンチセンス : YES

(v) 配列の記載 : 配列 I D番号 2 2

CGCTGTACCGA AAATCTCTAC TTTCGAGCCA GAAATAAACCC

48

(2) 配列 I D番号 2 1 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 36塩基対
- (B) 型 : 桟駒
- (C) 繼の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(II) 分子の種類 : cDNA

(III) ハイボセティカル配列 : NO

(iv) アンチセンス : NO

(v) 配列の記載 : 配列 I D番号 2 1

GGCCCTTCGA ACACATTTTC TGCCCTCCCT CACACC

(2) 配列 I D番号 2 3 の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 42塩基対
- (B) 型 : 桟駒
- (C) 繼の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

(II) 分子の種類 : cDNA

(III) ハイボセティカル配列 : NO

(iv) アンチセンス : NO

(v) 配列の記載 : 配列 I D番号 2 3

TTACAAAGTA CACATTTCG CCACACCGTC CGCCGAGGCA CC

49

## (2) 配列 ID番号 24 の情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 30 塩基対
- (B) 型 : 桁駆
- (C) 頭の数 : 一本頭
- (D) トポロジー : 直線状
- (II) 分子の種類 : cDNA
- (III) ハイボセティカル配列 : NO
- (IV) アンチセンス : YES
- (V) 配列の記載 : 配列 ID番号 24

CATCAAGCTT CTAACACTCT CCCCTTGTGA

## (2) 配列 ID番号 26 の情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 30 塩基対
- (B) 型 : 桁駆
- (C) 頭の数 : 一本頭
- (D) トポロジー : 直線状
- (II) 分子の種類 : cDNA
- (III) ハイボセティカル配列 : NO
- (IV) アンチセンス : YES
- (V) 配列の記載 : 配列 ID番号 26

CCTCATCCAG TAGTCAGTGA AGATGAAATCC

30

## (2) 配列 ID番号 25 の情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 31 塩基対
- (B) 型 : 桁駆
- (C) 頭の数 : 一本頭
- (D) トポロジー : 直線状
- (II) 分子の種類 : cDNA
- (III) ハイボセティカル配列 : NO
- (IV) アンチセンス : NO
- (V) 配列の記載 : 配列 ID番号 25

TCGGATCGAT CAAGCTTACG AGTTACTGAG C

## (2) 配列 ID番号 27 の情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 30 塩基対
- (B) 型 : 桁駆
- (C) 頭の数 : 一本頭
- (D) トポロジー : 直線状
- (II) 分子の種類 : cDNA
- (III) ハイボセティカル配列 : NO
- (IV) アンチセンス : NO
- (V) 配列の記載 : 配列 ID番号 27

GACTACTGGA TGAGCTGGT CCCGCCAGCT

31

## (2) 配列 ID番号 28 の情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 40 塩基対
- (B) 型 : 桁駆
- (C) 頭の数 : 一本頭
- (D) トポロジー : 直線状
- (II) 分子の種類 : cDNA
- (III) ハイボセティカル配列 : NO
- (IV) アンチセンス : NO
- (V) 配列の記載 : 配列 ID番号 28

TTAGTTTGTG TAACTGCCAT CATAATTAAAT ATCTCCGACC GACTCCAG

## (2) 配列 ID番号 30 の情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 33 塩基対
- (B) 型 : 桁駆
- (C) 頭の数 : 一本頭
- (D) トポロジー : 直線状
- (II) 分子の種類 : cDNA
- (III) ハイボセティカル配列 : NO
- (IV) アンチセンス : YES
- (V) 配列の記載 : 配列 ID番号 30

GTAACCTGGT TGTACCCCTC TTGGCACACAA ATA

32

## (2) 配列 ID番号 29 の情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 41 塩基対
- (B) 型 : 桁駆
- (C) 頭の数 : 一本頭
- (D) トポロジー : 直線状
- (II) 分子の種類 : cDNA
- (III) ハイボセティカル配列 : NO
- (IV) アンチセンス : YES
- (V) 配列の記載 : 配列 ID番号 29

GGCACTTACA CAAACTATGCC ACCATCCCTA AGCAATCCAT TCACTATCTC C

## (2) 配列 ID番号 31 の情報

## (i) 配列の特徴

- (A) 長さ : 41 塩基対
- (B) 型 : 桁駆
- (C) 頭の数 : 一本頭
- (D) トポロジー : 直線状
- (II) 分子の種類 : cDNA
- (III) ハイボセティカル配列 : NO
- (IV) アンチセンス : NO
- (V) 配列の記載 : 配列 ID番号 31

GAGCTACAAAC CGAGTTACTGC CGCCCAAGCC TCACTATGCA CAGTGCTCC

33

特表平7-504808 (15)

#### (2) 配列 ID番号32の値報

## (1) 纪列の修改

- (A) 長さ: 36塩基対
- (B) 型: 技術
- (C) 算の数: 一本鎖
- (D) トガロジー: 直鎖状
- (E) 分子の種類: cDNA
- (F) ハイポセティカル配列: #0
- (G) アンチセンス: %0
- (H) 配列の記載: 配列 1 D番号 3 2

TAGACTCCTG ACCGAATTGG CACACCCCCG AACGTG

34

### (2) 配列1D番号34の情報

### (i) 定列の特徴

- (A) 長さ : 33塩基対
- (B) 型 : 構成
- (C) 箇数の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (E) 分子の種類 : cDNA
- (F) ハイポセティカル配列 : 10
- (G) アンチセンス : YES
- (H) 配列の記載 : 配列 ID番号 34

AAGCCTTCGGT CGAAATTCAATT TACCCCCC...CA CAC

33

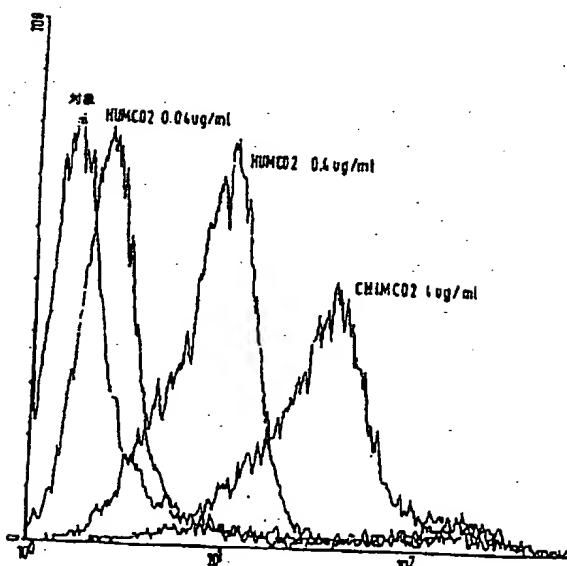
(2) 配列 I D番号 33 の情報

## (1) 配列の特徴

- (A) 長さ: 48塩基対
- (B) 型: 線状
- (C) 種の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直線状
- (E) 分子の種類: cDNA
- (F) ハイボセティカル配列: 80
- (G) アンチセンス: 80
- (H) 配列の記載: 配列 ID番号 3 3

GGTGCCTCCCTT TTAACCTTTC CGGTCAAGCC TCACTACTCA CACTCTCC

4



〔圖 1〕

International Application No.		PCT/GB 92/02251
CONTINUATION-PRIORITY DOCUMENTS		
Country / Date of filing, with indication, where appropriate, of the priority document		Received in Patent Office
A	WO/A 8 609 344 (CREATIVE BIOMOLECULES, INC.) 1 December 1984  JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY vol. 196, no. 4, 1987, ACADEMIC PRESS pages 901 - 917 Chothia, C.; Lesk, A.M.; 'Canonical' structures of the hypervariable regions of Immunoglobulins.'	

This ensures that the patent family members relating to the patent document cited in the file records and International search report.  
The numbers are to be consulted in the European Patent Office (EPO) file or  
The European Patent Office is not responsible for documents which are merely given for the purpose of information.

04/02/81

Patent document cited in search report	Publishing date	Patent family number	Publishing date
WO-A-9103964	11-07-91	AU-A- 6974091	24-07-91
		AU-A- 7032291	24-07-91
		AU-A- 7048591	24-07-91
		EP-A- 0460167	11-12-91
		EP-A- 0460171	11-12-91
		EP-A- 0460178	11-12-91
		EP-A- 9109956	11-07-91
		WO-A- 9109957	11-07-91
		GB-A- 2246781	12-02-92
		GB-A- 2246570	05-02-92
		JP-T- 4505398	24-09-92
		JP-T- 4506458	12-11-92
WO-A-9008167	26-07-90	None	
WO-A-9109967	11-07-91	AU-A- 6974091	24-07-91
		AU-A- 7032291	24-07-91
		AU-A- 7048591	24-07-91
		EP-A- 0460167	11-12-91
		EP-A- 0460171	11-12-91
		EP-A- 0460178	11-12-91
		WO-A- 9109956	11-07-91
		WO-A- 9109957	11-07-91
		GB-A- 2246781	12-02-92
		GB-A- 2246570	05-02-92
		JP-T- 4505398	24-09-92
		JP-T- 4506458	12-11-92
WO-A-8609344	01-12-86	AU-B- 612770	11-07-91
		AU-B- 1824588	11-07-91
		AU-B- 6579951	13-03-92
		EP-A- 0218554	07-01-93
		JP-T- 2500320	08-01-93
		US-A- 5132405	21-07-92
		US-A- 5091613	25-02-92

For more details about the Patent see Official Journal of the European Patent Office, No. 82/87

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.  
C 12 N 5/10  
15/09 ZNA  
//(C 12 P 21/08  
C 12 R 1:91)

F I

(71)出願人 ウォルシュ、ルイス  
イギリス国、シービー2・1キューピー、  
ケンブリッジ、テニス・コート・ロード  
(番地無し), イムノロジー・ディビジョン、  
デパートメント・オブ・パソロジー、  
ケンブリッジ・ユニバーシティー

(72)発明者 ワルドマン、ハーマン  
イギリス国、シービー2・1キューピー、  
ケンブリッジ、テニス・コート・ロード  
(番地無し), イムノロジー・ディビジョン、  
デパートメント・オブ・パソロジー、  
ケンブリッジ・ユニバーシティー

(72)発明者 ウォルシュ、ルイス  
イギリス国、シービー2・1キューピー、  
ケンブリッジ、テニス・コート・ロード  
(番地無し), イムノロジー・ディビジョン、  
デパートメント・オブ・パソロジー、  
ケンブリッジ・ユニバーシティー

(72)発明者 クローエ、ジェームズ・スコット  
イギリス国、ピーアール3・3ピーエス、  
ケント、ベッケンハム、ラングレイ・コー  
ト(番地無し)、ウエルカム・リサーチ・  
ラボラトリーズ

(72)発明者 ルイス、アラン・ビーター  
イギリス国、ピーアール3・3ピーエス、  
ケント、ベッケンハム、ラングレイ・コー  
ト(番地無し)、ウエルカム・リサーチ・  
ラボラトリーズ